·临床研究·

鼻咽癌组织中错配修复基因 hMLH1 的表达及意义*

谭晓虹[1],刘志辉[2△],岑 洪[1],李 刚[3],劳永聪[1]
(1.广西医科大学附属肿瘤医院化疗三科,南宁 530021;2.广西医科大学附属肿瘤医院化疗一科,南宁 530021;3.广西壮族自治区梧州市红十字会医院化疗一科 543002)

摘 要:目的 探讨人类鼻咽癌(NPC)组织中错配修复基因 hMLH1 的表达及其与临床病理特征的关系。**方法** 采用免疫组化两步法检测 132 例鼻咽癌组织、50 例鼻咽部慢性炎症的黏膜组织中 hMLH1 的表达。**结果** 鼻咽癌组织中 hMLH1 的阳性表达率为 55.30%,明显低于鼻咽部慢性炎症的黏膜组织中 hMLH1 的阳性表达率(76.00%,$P<0.05$),鼻咽癌组织中 hMLH1 表达与鼻咽癌 T、N 分期,以及临床分期、远处转移有关($P<0.05$);与年龄、性别无关($P>0.05$)。**结论** 鼻咽癌组织中 hMLH1 表达水平明显下调,hMLH1 可能成为预测鼻咽癌预后的生物学指标之一。

关键词:鼻咽肿瘤;免疫组织化学;人类 mut1 同源物 1 基因
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.36.022 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2011)36-3689-02

Expression of mismatch repair gene hMLH1 in tissue of human nasopharyngeal carcinoma and its significance*

Tan Xiaohong[1],*Liu Zhihui*[2△],*Cen Hong*[1],*Li Gang*[3],*Lao Yongcong*[1]
(1.*The Third Department of Chemotherapy,the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University,Nanning,Guangxi* 530021,*China*;2.*the First Department of Chemotherapy,the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University,Nanning,Guangxi* 530021,*China*;3.*the First Department of Chemotherapy,Wuzhou Red Cross Hospital,Wuzhou,Guangxi* 543002,*China*)

Abstract:Objective To explore the expression of mismatch repair gene hMLH1 in tissue of human nasopharyngeal carcinoma (NPC) and its relation to clinical pathological features. **Methods** Two-step immunohistochemistry was employed to detect the expression of hMLH1 in 132 tissue samples of NPC and 50 mucosa tissue samples of chronic nasopharyngeal inflammation. **Results** The positive expression rate of hMLH1 in NPC tissue was 55.30%,which was significantly lower than that(76.00%) in mucosa tissue of chronic nasopharyngeal inflammation($P<0.05$). The expression of hMLH1 in NPC tissue had relationship with T,N staging and clinical staging of NPC as well as the presence of distant metastasis($P<0.05$),while no relationship with age and gender. **Conclusion** The expression level of hMLH1 decreases in NPC tissue and hMLH1 may serve as one of biological markers to predict the prognosis of NPC.

Key words:nasopharyngeal neoplasms;immunohistochemistry;human mutl homolog 1

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是由遗传和环境等因素相互作用所致的多基因疾病,除了癌基因活化以及抑癌基因失活外,还有 DNA 修复基因的改变。DNA 修复基因在维持基因组功能完整性、修复致癌因素所致的损伤及抗癌过程中有着重要作用。目前鼻咽癌组织中关于错配修复基因 hMLH1 的研究较少,本研究通过免疫组化的方法检测鼻咽癌组织中 hMLH1 的表达,并探讨其与鼻咽癌临床病理特征之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集广西医科大学附属肿瘤医院 2010 年1～12 月 132 例经病理检查确诊为鼻咽部鳞状细胞癌的初治病例标本,其中男 98 例,女 34 例;中位年龄 45 岁。并设同期鼻咽部慢性炎症的黏膜活检组织标本 50 例为对照组。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 抗人 hMLH1 单克隆抗体购自 Zymed 公司,二步法免疫组化 MaxVision™ 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新公司,磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH=7.5)、枸橼酸盐抗原修复液(0.01 mol/L,pH=6.0)为国产分析纯试剂,用双蒸水配置。

1.2.2 操作方法 全部标本经 10%甲醛固定后石蜡包埋,常规制片,按免疫组化二步法进行染色,操作步骤按试剂盒说明书进行。用已知标准片作为阳性对照,以磷酸缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.2.3 结果判断 由两名经验丰富的病理科医师对结果进行判断,hMLH1 阳性表达定位于细胞核内呈棕褐色颗粒。在高倍视野计数 1 000 个癌细胞,参考 Son 等[1]方法判断。着色强度:不着色为 0 分,弱阳性为 1 分,中等阳性为 2 分,强阳性为 3 分。阳性细胞 0%～5%为 0 分,6%～20%为 1 分,21%～80%为 2 分,>80%为 3 分,两种得分之积小于或等于 4 分为阴性,>4 分为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计分析,计数资料的差异性分析使用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 hMLH1 在鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症的黏膜组织中的表

* **基金项目:**广西壮族自治区卫生厅广西医疗卫生重点科研课题资助项目(200967)。 △ **通讯作者**,Tel:13877155907;E-mail:lzhh101@sina.com。

达情况　hMLH1 在鼻咽癌组织中的阳性表达率为 55.30%(73/132)，鼻咽部慢性炎症的黏膜组织中阳性表达率为 76.00%(38/50)，鼻咽癌组织 hMLH1 表达明显低于鼻咽部慢性炎症的黏膜组织($P<0.05$)，见封 3 图 1、2。

2.2 hMLH1 表达与鼻咽癌临床病理特征的关系　hMLH1 表达与 T、N 分期，以及临床分期、远处转移有关($P<0.05$)，分期越晚，hMLH1 表达阳性率有逐渐下降的趋势，而与年龄、性别无关($P>0.05$)，见表 1。

表 1　hMLH1 表达与鼻咽癌患者相关指标的关系

项目	n	阳性数	阳性率(%)	χ^2	P
T 分期					
T1	21	16	76.19		
T2	43	29	67.44		
T3	36	18	50.00		
T4	32	10	31.25	14.169 0	0.003
N 分期					
N0	28	22	78.57		
N1	37	23	62.16		
N2	44	20	45.45		
N3	23	8	34.78	12.481 7	0.006
临床分期					
Ⅰ	19	15	78.95		
Ⅱ	41	27	65.85		
Ⅲ	43	21	48.84		
Ⅳa	29	10	34.48	11.956 4	0.008
复发、转移					
无	103	63	61.17		
有	29	10	34.48	6.517 5	0.011
性别					
男	98	53	54.08		
女	34	20	58.82	0.229 6	0.631
年龄(岁)					
≥45	72	42	58.33		
<45	60	31	51.67	0.588 4	0.442

3　讨　论

hMLH1 基因是人类错配修复基因中研究较多的一种，1994 年由 Bronner 等[2]在研究遗传性非息肉性结直肠癌的过程中发现，它定位于染色体的 3P21.3-23，基因组 DNA 全长约 58 kb(不包括启动子)，含 19 个外显子，cDNA 全长 2 484 bp，编码长度为 2 268 bp 的开放阅读框架。hMLH1 蛋白与其功能相对均匀定位于细胞核，在正常细胞组织中表达良好[3]。目前研究表明 hMLH1 基因表达下调与多种肿瘤发生有关，如头颈部鳞癌[4]、口腔鳞癌[5-6]、胃癌[7]、结直肠癌[8]、肝癌[9]、肾癌[10]、食管癌[11]等，而 hMLH1 表达下调主要与启动子甲基化及微卫星不稳定性(MSI)有关。

韩为农等[12]用 cDNA 阵谱比较鼻咽癌组织及鼻咽部正常组织的基因表达谱发现 hMLH1 处于下调状态，提示 hMLH1 可能与鼻咽癌发生有一定关系。推测在鼻咽细胞癌变过程中，hMLH1 表达下调导致错配修复效率的下调，使 DNA 修复功能受到抑制，受损 DNA 不能得到即时修复，从而引起细胞的自发性突变，参与鼻咽癌的多步骤、多阶段过程。

局部原发灶分期、区域淋巴结转移、远处脏器转移是影响鼻咽癌预后的重要因素，局部分期越晚、有局部淋巴结转移及远处脏器转移的患者生存期较短。本研究结果显示，hMLH1 表达与鼻咽癌 T、N 分期，以及临床分期、远处转移有关($P<0.05$)，与年龄、性别无关($P>0.05$)。T、N 分期及临床分期越晚，hMLH1 的表达有逐步下降的趋势，提示 hMLH1 表达下调有可能是鼻咽癌预后不良的分子标志。Zuo 等[4]认为 hMLH1 表达下调是头颈部鳞癌的预后不良因素。但是 Park 等[13]认为在散发性结直肠癌中 hMLH1 下调与淋巴结转移数、是否有远处器官转移有关，淋巴结转移数少、无远处器官转移者 hMLH1 下调更多见，hMLH1 下调者总生存期明显还长。这些研究结果的差异说明 hMLH1 有可能在不同恶性肿瘤的发生、发展过程中所起的作用不同。

本研究通过免疫组化法检测 hMLH1 蛋白表达，发现鼻咽癌组织 hMLH1 蛋白表达明显低于鼻咽部慢性炎症的黏膜组织，提示鼻咽癌的发生可能与 hMLH1 表达下调有关。并且 hMLH1 蛋白表达下调与 T、N 分期，以及临床分期、远处转移有关，但 hMLH1 表达下调的具体机制以及 hMLH1 是否能成为鼻咽癌新的分子预后指标尚待深入研究。

参考文献：

[1] Son BH, Ahn SH, Ko CD, et al. Significance of mismatch repair protein expression in the chemotherapeutic response of sporadic invasive ductal carcinoma of the breast [J]. Breast J, 2004, 10(1): 20-26.

[2] Bronner CE, Baker SM, Morrism PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer[J]. Nature, 1994, 368(6468): 258-261.

[3] Fishel R, Acharya S, Berardini M, et al. Signaling mismatch repair: the mechanics of an adenosine-nucleotide molecular switch[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2000(65): 217-224.

[4] Zuo C, Zhang H, Spencer HJ, et al. Increased microsatellite instability and epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2009, 141(4): 484-490.

[5] González-Ramírez I, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, et al. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer[J]. Oral Oncol, 2011, 47(1): 22-26.

[6] Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, et al. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Dis, 2009, 15(3): 206-213.

[7] Gu M, Kim D, Bae Y, et al. Analysis of microsatellite instability, protein expression and methylation status of hMLH1 and hMSH2 genes in gastriccar-cinomas[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(91/92): 899-904.

(下转第 3693 页)

via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. J Appl Physiol, 2004, 97(4): 1550-1558.

[4] Puglisi F, Puppin C, Pegolo E, et al. Expression of periostin in human breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2008, 61(4): 494-498.

[5] Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T, et al. Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon[J]. J Histochem Cytochem, 2008, 56(8): 753-764.

[6] Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, et al. Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 6928-6935.

[7] Fukushima N, Kikuchi Y, Nishiyama T, et al. Periostin deposition in the stroma of invasive and intraductal neoplasms of the pancreas[J]. Mod Pathol, 2008, 21(8): 1044-1053.

[8] Puppin C, Fabbro D, Dima M, et al. High periostin expression correlates with aggressiveness in papillary thyroid carcinomas[J]. J Endocrinol, 2008, 197(2): 401-408.

[9] Contié S, Voorzanger-Rousselot N, Litvin J, et al. Increased expression and serum levels of the stromal cell-secreted protein periostin in breast cancer bone metastases[J]. Int J Cancer, 2011, 128(2): 352-360.

[10] Ben QW, Zhao Z, Ge SF, et al. Circulating levels of periostin may help identify patients with more aggressive colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(3): 821-828.

[11] Hong L, Sun H, Lv X, et al. Expression of periostin in the serum of NSCLC and its function on proliferation and migration of human lung adenocarcinoma cell line (A549) in vitro[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(5): 2285-2293.

[12] Baril P, Gangeswaran R, Mahon PC, et al. Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the beta4 integrin and the PI3k pathway[J]. Oncogene, 2007, 26(14): 2082-2094.

[13] Erkan M, Kleeff J, Gorbachevski A, et al. Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity[J]. Gastroenterology, 2007, 132(4): 1447-1464.

[14] Horikawa T, Yang J, Kondo S, et al. Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 1970-1978.

[15] Nishioka R, Itoh S, Gui T, et al. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo[J]. Exp Mol Pathol, 2010, 89(2): 149-157.

[16] Tilman G, Mattiussi M, Brasseur F, et al. Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells[J]. Mol Cancer, 2007, 17(6): 80.

[17] Battula VL, Evans KW, Hollier BG, et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2010, 28(8): 1435-1445.

[18] Turner C, Kohandel M. Investigating the link between epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype: A mathematical approach[J]. J Theor Biol, 2010, 265(3): 329-335.

[19] Kong QL, Hu LJ, Cao JY, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces an epithelial-mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like cancer cells in nasopharyngeal carcinoma[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(6): e1000940.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-07-12)

(上接第 3690 页)

[8] Egoavil CM, Montenegro P, Soto JL, et al. Clinically important molecular features of Peruvian colorectal tumours: high prevalence of DNA mismatch repair deficiency and low incidence of KRAS mutations[J]. Pathology, 2011, 43(3): 228-233.

[9] Helal TE, Khamis NS, El-Sharkawy TM, et al. Immunohistochemical expression of mismatch repair genes (hMSH2 and hMLH1) in hepatocellular carcinoma in Egypt[J]. APMIS, 2010, 118(12): 934-940.

[10] Altavilla G, Fassan M, Busatto G, et al. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression in renal tumors[J]. Oncol Rep, 2010, 24(4): 927-932.

[11] Farris AB 3rd, Demicco EG, Le LP, et al. Clinicopathologic and Molecular Profiles of Microsatellite Unstable Barrett Esophagus-associated Adenocarcinoma[J]. Am J Surg Pathol, 2011, 35(5): 647-655.

[12] 韩为农,李虹,谢鹭,等. 人鼻咽与鼻咽癌 cDNA 阵谱中 DNA 修复相关基因表达差异的初步研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(2): 114-117.

[13] Park JW, Chang HJ, Park S, et al. Absence of hMLH1 or hMSH2 expression as a stage-dependent prognostic factor in sporadic colorectal cancers[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(11): 2839-2846.

(收稿日期:2011-05-26 修回日期:2011-09-01)